

## エンドトキシンにより急性呼吸不全を呈したラットに対する 終末呼気陽圧とサーファクタント補充療法の効果

金沢大学医学部医学科麻酔・蘇生学講座 (主任: 小林 勉教授)

田 代 勝 己

エンドトキシンを成熟ラット (体重 320-440g) 56匹の気管内に注入して急性呼吸不全を発症させたいえ、終末呼気陽圧 (positive end-expiratory pressure, PEEP) とサーファクタント補充療法の効果を検討した。ペントバルビタールの腹腔内投与でラットを麻酔したのち、純酸素により最大吸気圧を 25cmH<sub>2</sub>O に設定した従圧式人工呼吸で管理し、実験1と2を行った。実験1では、大腸菌エンドトキシン 60mg/kg を気管内に注入した。その際、終末呼気圧を 0cmH<sub>2</sub>O (zero end-expiratory pressure, ZEEP) のままにしておくと、動脈血酸素分圧 (arterial oxygen pressure, PaO<sub>2</sub>) は、500mmHg 前後から注入後30分目に 98±68mmHg (平均値±標準偏差, n=12) へと急激に低下した。一方、7.5cmH<sub>2</sub>O の PEEP を保っておくと、エンドトキシンを注入しても実験終了時 (注入後120分) まで PaO<sub>2</sub> は 430mmHg 前後 (n=12) にとどまり、ZEEP の際に比べ有意差 (P<0.05) が認められた。PEEP の付加により肺水腫液の出現量は有意に減少したが、気管支肺胞洗浄液中の好中球数には有意差が認められなかった。実験2では、エンドトキシン 53±19mg/kg を注入した後、PaO<sub>2</sub> の低下に合わせて PEEP を段階的に 7.5cmH<sub>2</sub>O まで増加させた。エンドトキシン注入から約280分後に、急性呼吸窮迫症候群と見なしう呼吸不全が出現した。すなわち、PaO<sub>2</sub> が 521mmHg 前後から 106±23mmHg に低下し、胸部レントゲン写真で肺野に浸潤影が見られるようになった。この時点で動物を無作為に3群に分けた。生食対照群 (n=8) と空気対照群 (n=8) には、それぞれ 2.0ml/kg の生理食塩水または空気を投与し、サーファクタント群 (n=16) にはブタの肺から抽出した天然加工型サーファクタント (50mg/ml) を 2.0ml/kg あて投与した。生食対照群と空気対照群の PaO<sub>2</sub> の平均値は、実験終了時 (群分け後180分) に至るまで、130mmHg 以下にとどまった。一方、サーファクタント群では、15分目に PaO<sub>2</sub> が 390±116mmHg に上昇し (生食対照群および空気対照群に対し P<0.05)、実験終了時まで 400mmHg 前後の値で推移した。また、動的肺-胸郭コンプライアンス、静的肺圧量曲線、胸部レントゲン写真、および組織学的所見も改善した。以上より、予防的な PEEP の付加は、エンドトキシンの気管内注入による肺の変化のうち、好中球の集積を防止できないが、呼吸不全の進行を抑制すると結論された。また、PEEP では改善が困難な呼吸不全に対して、サーファクタント補充療法が有効であると結論された。

**Key words** acute respiratory distress syndrome, endotoxin, lung edema, positive end-expiratory pressure, surfactant

急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) の呼吸不全の治療には、終末呼気陽圧 (positive end-expiratory pressure, PEEP) を付加した人工呼吸の有効なことが一般に認められている<sup>1)~3)</sup>。しかし、PEEP を用いても症状の進行する症例が存在し、ARDS 患者の 16% 前後は、呼吸不全が原因で死亡している<sup>4)</sup>。ARDS の初期段階における病態は滲出性の変化が特徴的であり、肺胞上皮および毛細管内皮の透過性亢進により肺水腫が生ずる<sup>15)</sup>。ARDS の呼吸不全の発生機序には、この肺水腫液による肺サーファクタントの不活化が少なからず関与していると考えられている<sup>6)~8)</sup>。

肺サーファクタントの欠乏が原因で発症する新生児の呼吸窮迫症候群には、サーファクタントを経気道的に肺に投与する治療法 (サーファクタント補充療法) の有効性が確認されている<sup>9)~11)</sup>。したがって、ARDS に対してもサーファクタント補充

療法が有効であろうと想定される。今回著者は、エンドトキシンを気管内に注入したラットを用い、予防的に PEEP を付加した人工呼吸が、呼吸不全を防止できるか否かを検討した。さらに、PEEP を付加した人工呼吸のみでは改善が困難になった呼吸不全に対して、サーファクタント補充療法が有効であるか否かを検討した。

### 対象および方法

#### I. サーファクタントの調整

実験には、金沢大学麻酔・蘇生学教室で開発された補充療法用サーファクタント (surfactant CK, S-CK) を使用した。S-CK は、ブタの肺洗浄液から、遠心法、クロロフォルム/メタノール (2/1, v/v) による抽出法、0.5% 食塩水による洗浄法、およびアセトン沈殿法を経て採取し、98% のリン脂質と 1% の

平成8年8月5日受付, 平成8年8月26日受理

Abbreviations: ARDS, acute respiratory distress syndrome; PaCO<sub>2</sub>, arterial carbon dioxide pressure; PaO<sub>2</sub>, arterial oxygen pressure; PEEP, positive end-expiratory pressure; PIP, peak inspiratory pressure; S-CK, surfactant CK; ZEEP, zero end-expiratory pressure

疎水性タンパク質を主成分とするものである<sup>19</sup>。S-CK をラットに投与する際は、生理食塩水に分散し、50mg/ml の濃度に調整した。

## II. 動物実験

体重 320~440g の成熟ウィスター系ラットを合計66匹を用い、実験1と実験2を行った。

### 1. PEEP の効果に関する検討 (実験1)

ラット24匹をペントバルビタール (大日本, 大阪) 30mg/kg の腹腔内投与で麻酔した後、気管切開孔より内径 1.5mm のチューブを挿入した。大腿動脈にカテーテルを挿入し、血圧測定と血液ガス分析のための採血路にあてた。大腿静脈にもカテーテルを挿入し、乳酸加リンゲル液を 10ml/kg/h の速度で持続投与した。実験中は、ペントバルビタール 15mg/kg の腹腔内間歇投与と、臭化パンクロニウム (日本オルガノン, 東京) 0.4mg/kg/h の持続的静注により、一定の麻酔深度と非動化を得た。

次いで、図1に示すように、人工呼吸器 Servo 900B (Siemens-Elcoma, Solna, Sweden) を組み込んだ回路に2匹のラットを接続し、最大吸気圧 (peak inspiratory pressure, PIP) を 25cmH<sub>2</sub>O に定めた従圧式の間歇的陽圧呼吸を開始した。なお、動物の肺コンプライアンスが変化しても PEEP の値が変動しないように、人工呼吸回路には容量 10 l の気密のビン (airtight jar) を装着した。実験の全経過を通じ、換気には純酸素を用い、呼吸回数を40回/分、吸気と呼気の時間比を 1:1 に固定した。

実験1では PEEP の有無により、ラットを無作為に2群に分けた。すなわち、終末呼気圧が 0cmH<sub>2</sub>O (zero end-expiratory pressure, ZEEP) のままの ZEEP 群と、7.5cmH<sub>2</sub>O の PEEP 群を設けた。その際、人工呼吸回路に同時に接続した2匹のラットは、1匹ずつ PEEP を変えることができないため同じ群に組入れられた。人工呼吸開始後15分目に、基準時の動脈血ガス分析を行った。ガス分析をしてから10分後に、すべてのラットに対して、大腸菌エンドトキシン 0111:B4 (Difco

Laboratories, Detroit, U.S.A.) の生理食塩水分散液 (20mg/ml) を 3ml/kg あて、気管内チューブを介して肺内に注入した。エンドトキシン注入後、30分、60分および120分目に動脈血ガス分析を行った。また、エンドトキシン注入後110分目に気管内吸引を行い、気道に出現した肺水腫液を可及的に除去し、その量を測定した。さらに、ZEEP 群では、120分目のガス分析を行った後に PEEP を 7.5cmH<sub>2</sub>O に増加させ、15分後に再びガス分析を行った。なお、動脈血の酸素分圧 (arterial oxygen pressure, PaO<sub>2</sub>) と炭酸ガス分圧 (arterial carbon dioxide pressure, PaCO<sub>2</sub>) は、全自動血液ガス分析装置 ABL-2 (Radiometer, Copenhagen, Denmark) で測定した。

実験終了後、致死量に近いペントバルビタールを静注し、気管内チューブを閉塞して吸収性無気肺を作成するとともにラットを屠殺した。開胸後、ラットを肺圧量曲線記録装置に接続し、気道内圧を1分間毎に 5cmH<sub>2</sub>O ずつ段階的に 30cmH<sub>2</sub>O まで上昇させ、次いで同様に 0cmH<sub>2</sub>O まで低下させて、それぞれの気道内圧における肺の容量を記録した<sup>19</sup>。肺圧量曲線を記録した後、室温の生理食塩水 25ml/kg を注射器で肺に注入し、その後ただちに吸引し、再び注入・吸引するという2重気管支肺胞洗浄を行った。回収された気管支肺胞洗浄液を、300×g で10分間遠心し、沈渣の塗抹標本を作成した。また、この既知量の沈渣にチュルク液 (和光純薬, 大阪) を加え、トーマ血球計測盤 (宣恒医理科工業, 東京) を用いて気管支肺胞洗浄液 1ml あたりの細胞数を算出した。塗抹標本については、ギムザ染色の後、顕微鏡下で200個前後の細胞分画を判定し、気管支肺胞洗浄液中の好中球数を計算した。

### 2. サーフアクトン補充療法の効果に関する検討 (実験2)

ラット42匹を、実験1と同様にペントバルビタールで麻酔した後、気管切開孔より挿管し、臭化パンクロニウムで非動化した。次いで、2匹のラットを一組にして実験1と同様の人工呼吸回路に並列に接続し、PIP を 25cmH<sub>2</sub>O に、PEEP を 7.5cmH<sub>2</sub>O に設定した従圧式の間歇的陽圧呼吸を開始した。な

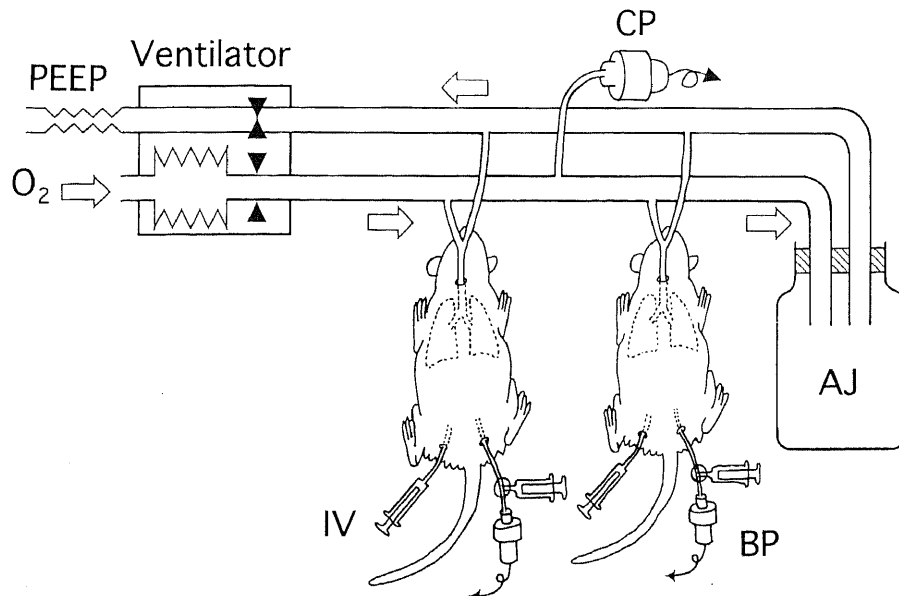


Fig. 1. Diagram of experimental setup. Open arrows indicate direction of oxygen flow. AJ, airtight jar; BP, blood pressure; CP, circuit pressure; IV, intravenous infusion; O<sub>2</sub>, oxygen; PEEP, positive end-expiratory pressure.

お、実験の全経過を通じて、吸気ガスには純酸素を用い、呼吸回数を40回/分、吸気と呼気の時間比を1:1に固定した。

人工呼吸開始後15分目に、基準時の動脈血ガス分析、1回換気量測定および胸部レントゲン撮影を行った。基準時の値を測定した15分後に、PIPを20cmH<sub>2</sub>Oに、PEEPを0cmH<sub>2</sub>Oにそれぞれ低下させた後、すべてのラットに対して、大腸菌エンドトキシンの生理食塩水分散液(20mg/ml)を2ml/kg あて、気管内チューブを介して肺に注入した。エンドトキシン注入後、30分毎にPaO<sub>2</sub>を測定した。なお、エンドトキシン注入後30分目のPaO<sub>2</sub>が400mmHg以上を示したラットに対しては、同量のエンドトキシンを再度注入した。

一組にした両方のラットのPaO<sub>2</sub>が、200mmHg以下に低下した時点で、まずPIPを25cmH<sub>2</sub>Oに高めた。以後、PaO<sub>2</sub>が200mmHg以下に低下した時点で、PEEPを2.5cmH<sub>2</sub>Oずつ増加させた。PIPを25cmH<sub>2</sub>Oに、PEEPを7.5cmH<sub>2</sub>Oに増加させても両方のラットのPaO<sub>2</sub>が200mmHg以上に上昇しなくなった時点で、気管内吸引により出現した肺水腫液を可及的に除去し、15分後にPaO<sub>2</sub>を測定した。以後15分毎に、気管内吸引とPaO<sub>2</sub>の測定を繰り返し、気管内吸引によってもPaO<sub>2</sub>が200mmHg以上を示さなくなった時点を経直前時として、1回換気量測定および胸部レントゲン撮影を行った。一組にした2匹のラットのうち、どちらかがこの時点までに死亡した場合は、その組の全ての計測値を統計処理から除外した。

群分け前の動脈血ガスを測定した15分後に、一組にした2匹のラットを、サーファクタント群および対照群に無作為に分けた。サーファクタント群に対しては、S-CKの分散液を2ml/kg(100mg/kg) あて気管内チューブを介して投与した。さらに、対照群のラットを無作為に、生食対照群および空気対照群に分けた。生食対照群に対しては、生理食塩水を2ml/kg あて気管内チューブを介して投与した。また、空気対照群に対しては、空気を2ml/kg あて気管に注入するという擬似操作を行った。なお、群分け後は、換気条件およびラットの体位を変更せず、気管内吸引も行わなかった。

群分け後、15, 30, 60, 120および180分目に動脈血ガス分析を行った。また、180分目の時点では、1回換気量の測定と胸部レントゲン撮影を追加した。各ラットの1回換気量は、気管内チューブに気流抵抗管TV-241T(日本光電、東京)を接続し、差圧検出器TP-602T(日本光電)、呼吸用アンプAR-601G(日本光電)および換気量ユニットAQ-601G(日本光電)を介して求めた。なお、この1回換気量(ml)を換気圧(PIP-PEEP, cmH<sub>2</sub>O)と体重(kg)で除して、動的肺-胸郭コンプライアンスを求めた。また、肺水腫液のタンパク質濃度をビウレット法(クリナライザーJCA-MS24, 日本電子、東京)により測定した。

実験終了後、実験1と同様の方法でラットを死亡させ、肺圧量曲線を記録した。その後、気道内圧を30cmH<sub>2</sub>Oに高めて肺胞をいったん拡張させたうえで、10cmH<sub>2</sub>Oに減圧して保持し、肺動脈より10%中性ホルマリンを1時間持続還流して肺組織を固定した。肺を摘出した後、切片をHE染色して、組織学的観察を行った。

### Ⅲ. 統計処理

測定結果は、平均値±標準偏差( $\bar{x} \pm SD$ )で表わした。生存率および2回目のエンドトキシンの投与が必要であったラットの割合は、Fisherの直接確率計算法を用いて比較した。その他

の数値の群内および群間の差の検定には、二元配置分散分析(ANOVA)を行ったうえ Bonferroniの方法を用い、危険率(P)が0.05以下をもって有意差と判定した。

## 成 績

### 1. PEEPの効果に関する検討(実験1)

ZEEP群およびPEEP群のラットの体重は、それぞれ376±43gおよび398±37gであり、両群間に有意差は認められなかった。ZEEP群のラットは、エンドトキシン注入後54分目から120分目までに12匹中5匹が死亡した。一方、PEEP群のラットは、12匹すべてが実験終了時まで生存し、生存率に両群間で有意差が認められた。エンドトキシンの注入後110分目に行った気管内吸引により、ZEEP群では2.3±0.8ml/kg、PEEP群では0.1±0.2ml/kgの肺水腫液が採取され、肺水腫液の量に両群間で有意差が認められた。

PaO<sub>2</sub>の変化を図2に示す。ZEEP群およびPEEP群の基準時のPaO<sub>2</sub>の平均値は、それぞれ507mmHgおよび512mmHgであり、両群間に有意差は認められなかった。ZEEP群のPaO<sub>2</sub>の平均値は、エンドトキシン注入後30分目に98mmHgに低下し(基準時の値に対しP<0.05)、120分目には57mmHgに低下した。なお、このZEEP群に対してエンドトキシン注入後120分目に7.5cmH<sub>2</sub>OのPEEPを15分間付加したが、PaO<sub>2</sub>の平均値は71mmHgにとどまり、有意な上昇とは判定されなかった。一方、PEEP群のPaO<sub>2</sub>の平均値は、エンドトキシン注入により若干低下したものの、実験終了時(注入後120分)まで430mmHg前後に維持され、ZEEP群に比べ有意に高い値を示した。

PaCO<sub>2</sub>の変化を図3に示す。ZEEP群およびPEEP群の基準時におけるPaCO<sub>2</sub>の平均値は、それぞれ12mmHgおよび26mmHgであり、ZEEP群はPEEP群に比べ有意に低い値を

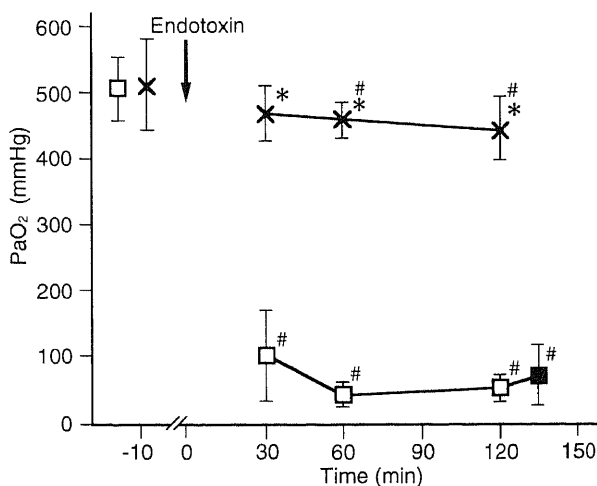


Fig. 2. Changes of arterial oxygen pressure (PaO<sub>2</sub>) in experiment 1. Values are  $\bar{x} \pm SD$ . \*P<0.05 vs. zero end-expiratory pressure (ZEEP) group. #P<0.05 vs. the baseline value. □, ZEEP group under zero end-expiratory pressure; ■, ZEEP group under 7.5 cmH<sub>2</sub>O positive end-expiratory pressure; ×, positive end-expiratory pressure (PEEP) group. The baseline value was obtained 10 min before the endotoxin injection. Zero time indicates the time when endotoxin was injected. Note interruption of time scale.

示した。ZEEP 群の  $\text{PaCO}_2$  は、エンドトキシン注入後30分目から基準時の値に比べ有意に増加し、120分目には 80mmHg 前後に達した。また、この時点で PEEP を付加しても、有意な変化は見られなかった。一方、PEEP 群の  $\text{PaCO}_2$  は、実験終了時まで 28mmHg 前後で有意な変化を示さず、エンドトキシン注入から60分目以降は、基準時とは逆に ZEEP 群に比べ有意に低い値を示した。

減圧時の肺圧量曲線を図4に示す。PEEP 群の肺気量は、最大加圧時 (30cmH<sub>2</sub>O 加圧時) から 5cmH<sub>2</sub>O に減圧するまでのす

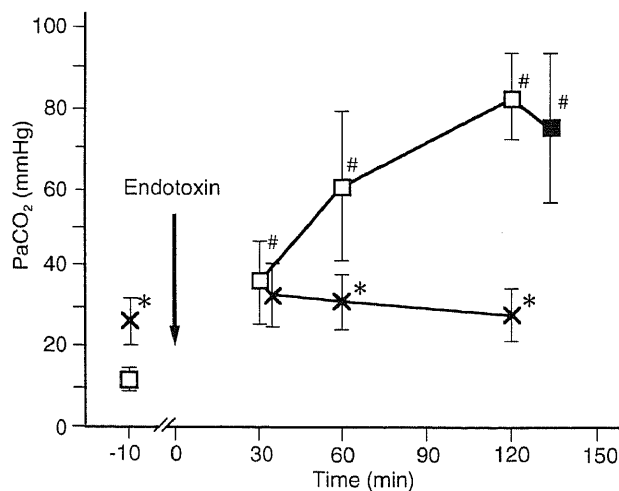


Fig. 3. Changes of arterial carbon dioxide pressure ( $\text{PaCO}_2$ ) in experiment 1. Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*  $P < 0.05$  vs. zero-end-expiratory pressure (ZEEP) group. \*  $P < 0.05$  vs. the baseline value.  $\square$ , ZEEP group under zero end-expiratory pressure;  $\blacksquare$ , ZEEP group under 7.5 cmH<sub>2</sub>O positive end-expiratory pressure;  $\times$ , positive end-expiratory pressure (PEEP) group. The baseline value was obtained 10 min before the endotoxin injection. Zero time indicates the time when endotoxin was injected. Note interruption of time scale.

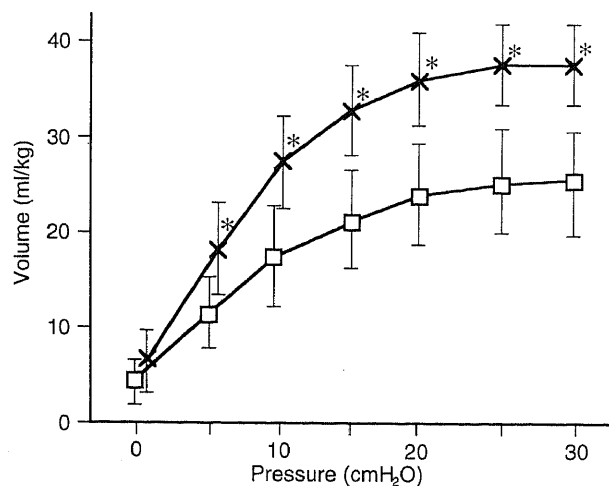


Fig. 4. Deflation limbs of static pressure-volume recordings of the lungs in experiment 1. Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*  $P < 0.05$  vs. zero end-expiratory pressure (ZEEP) group.  $\square$ , ZEEP group;  $\times$ , positive end-expiratory pressure (PEEP) group.

べての圧で、ZEEP 群より有意に大きい値を示した。回収された気管支肺胞洗浄液中の好中球は、ZEEP 群で  $2.8 \pm 2.0 \times 10^5/\text{ml}$ 、PEEP 群で  $2.2 \pm 1.6 \times 10^5/\text{ml}$  であり、両群間に有意差は認められなかった。

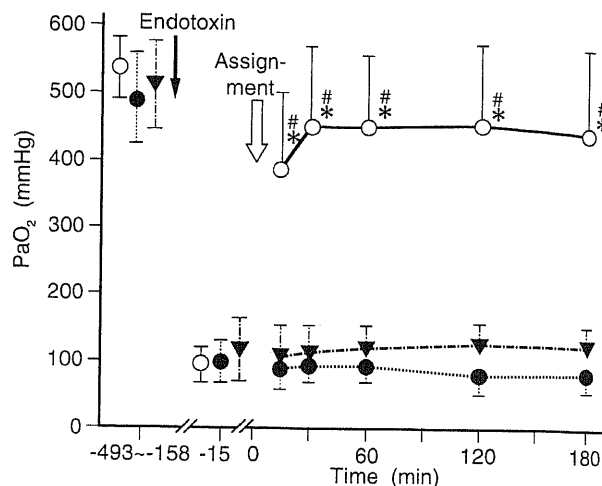


Fig. 5. Changes of arterial oxygen pressure ( $\text{PaO}_2$ ) in experiment 2. Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*  $P < 0.05$  vs. both the saline and air control groups. \*  $P < 0.05$  vs. the pre-assignment value.  $\circ$ , surfactant group;  $\bullet$ , saline control group;  $\blacktriangledown$ , air control group. The baseline value was obtained 15 min before the first injection of endotoxin. The first injection of endotoxin was performed 143~478 (range) min before the assignment. The pre-assignment value was obtained 15 min before the assignment. Zero time indicates the time when the rats were assigned. Note interruptions of time scale.

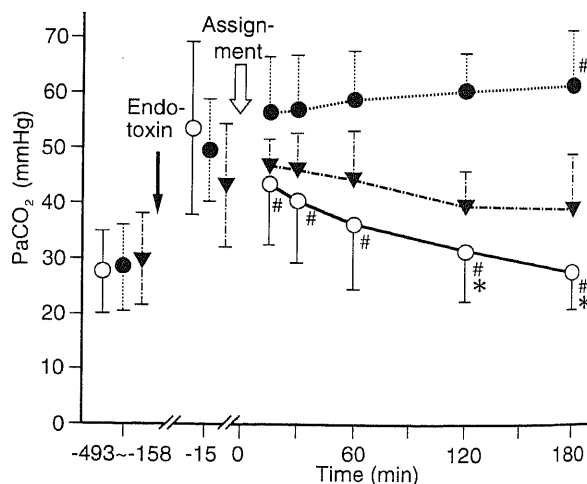


Fig. 6. Changes of arterial carbon dioxide pressure ( $\text{PaCO}_2$ ) in experiment 2. Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \*  $P < 0.05$  vs. both the saline and air control groups. \*  $P < 0.05$  vs. the pre-assignment value.  $\circ$ , surfactant group;  $\bullet$ , saline control group;  $\blacktriangledown$ , air control group. The baseline value was obtained 15 min before the first injection of endotoxin. The first injection of endotoxin was performed 143~478 (range) min before the assignment. The pre-assignment value was obtained 15 min before the assignment. Zero time indicates the time when the rats were assigned. Note interruptions of time scale.

## II. サーファクタント補充療法の効果に関する検討 (実験 2)

エンドトキシンの初回注入から群分け時点までに、5匹のラットが死亡したため、このラットが含まれていた5組を除外した。このため、実験2に用いた21組のうち、16組について統計処理を行った。16組すなわち32匹のラットは、サーファクタント群が16匹、生食対照群が8匹、および空気対照群が8匹であった。

サーファクタント群、生食対照群、および空気対照群のラットの体重は、それぞれ  $353 \pm 47$ g,  $334 \pm 53$ g, および  $348 \pm 42$ gであり、3群間に有意差は認められなかった。エンドトキシンの2回目の注入が必要であったラットの割合は、サーファクタント群で31% (5/16)、生食対照群で25% (2/8)、および空気対

照群で38% (3/8)であり、3群間に有意差はなかった。また、エンドトキシンの初回投与から群分けまでの時間は、サーファクタント群で  $286 \pm 119$ 分、生食対照群で  $269 \pm 109$ 分、および空気対照群で  $303 \pm 126$ 分であり、この時間にも3群間に有意差は認められなかった。サーファクタント群および生食対照群のラットは、群分け以後、全例が実験終了時まで生存した。一方、空気対照群では1匹が群分け後106分目に死亡した。しかし、生存率には、3群間に有意差が認められなかった。

群分け前に行った気管内吸引では、 $4.7 \pm 4.0$ ml/kg (全ラット,  $n=32$ ) の肺水腫液が得られた。肺水腫液中の蛋白質濃度の平均値は3.6g/dlであった。97% (31/32) のラットでは、気管内吸引を行っても  $\text{PaO}_2$  が200mmHg以下にとどまったが、1匹のみの  $\text{PaO}_2$  が274mmHgに上昇した。しかし、その  $\text{PaO}_2$  も、15分後には200mmHg以下に低下し、次の吸引では上昇しなかった。

基準時の  $\text{PaO}_2$  は  $521 \pm 57$ mmHg (全ラット,  $n=32$ ) であったが、エンドトキシン注入により群分け直前時には  $106 \pm 23$ mmHgに低下した。なお、これらの値には、3群間で有意差を認めなかった。図5に示すように、生食対照群および空気対照群の  $\text{PaO}_2$  の平均値は、群分け後180分間、130mmHg以下の低値で推移した。一方、サーファクタント群の  $\text{PaO}_2$  は、群分け後15分目に  $390 \pm 116$ mmHgに上昇し (生食対照群および空気対照群に対し  $P < 0.05$ , 群分け直前値に対し  $P < 0.05$ )、実験終了時まで有意に高い値を維持した。

基準時の  $\text{PaCO}_2$  は  $28 \pm 7$ mmHg (全ラット,  $n=32$ ) であったが、エンドトキシン注入により群分け直前時には  $54 \pm 24$ mmHgに上昇した。なお、これらの値には、3群間で有意差を認めなかった。図6に示すように、生食対照群の  $\text{PaCO}_2$  の平均値は、時間の経過とともに増加する傾向を示し、群分け180分目には62mmHgに達した (群分け直前値に対し  $P < 0.05$ )。空気対照群の  $\text{PaCO}_2$  は、群分け後の180分間、有意な変化を示さな

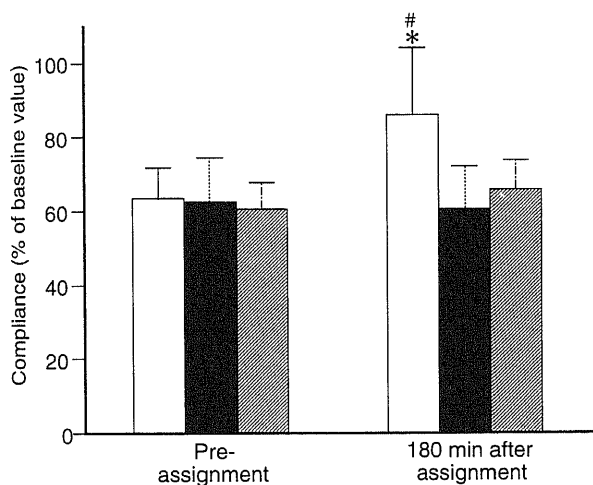


Fig. 7. Changes of dynamic lung-thorax compliances expressed as percentage of the baseline value in experiment 2. Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $P < 0.05$  vs. both the saline and air control groups. \* $P < 0.05$  vs. the pre-assignment value. □, surfactant group; ■, saline control group; ▨, air control group. Pre-assignment, time just before the assignment.

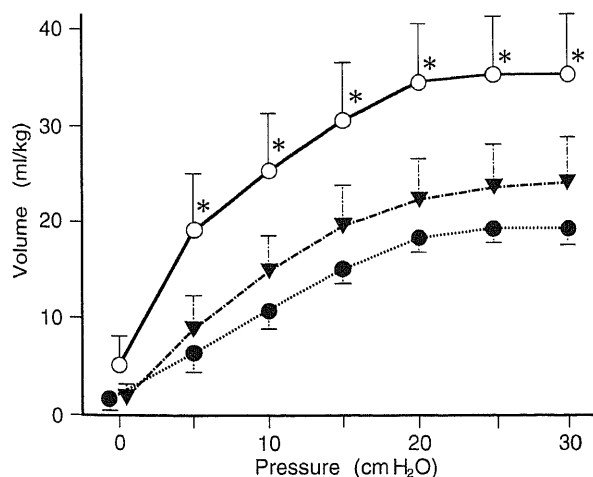


Fig. 8. Deflation limbs of static pressure-volume recordings of the lungs in experiment 2. Values are  $\bar{x} \pm \text{SD}$ . \* $P < 0.05$  vs. both the saline and air control groups. ○, surfactant group; ●, saline control group; ▼, air control group.

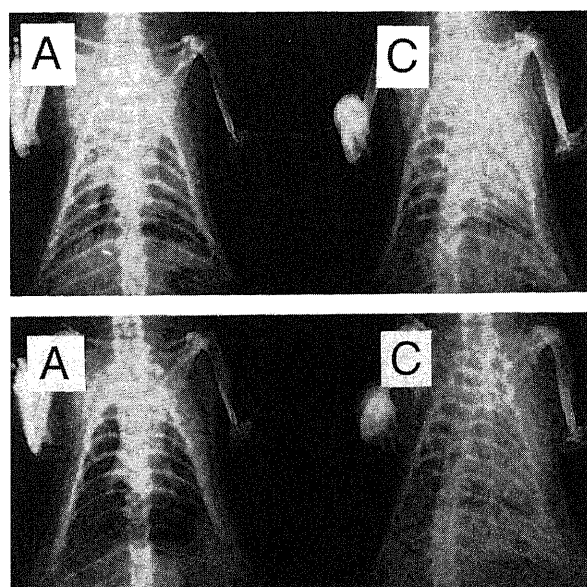


Fig. 9. Chest roentgenograms taken in a pair of rats in the surfactant group (A) and air control group (C). The upper panel was taken in the pre-assignment period; the lower, 180 min after assignment.

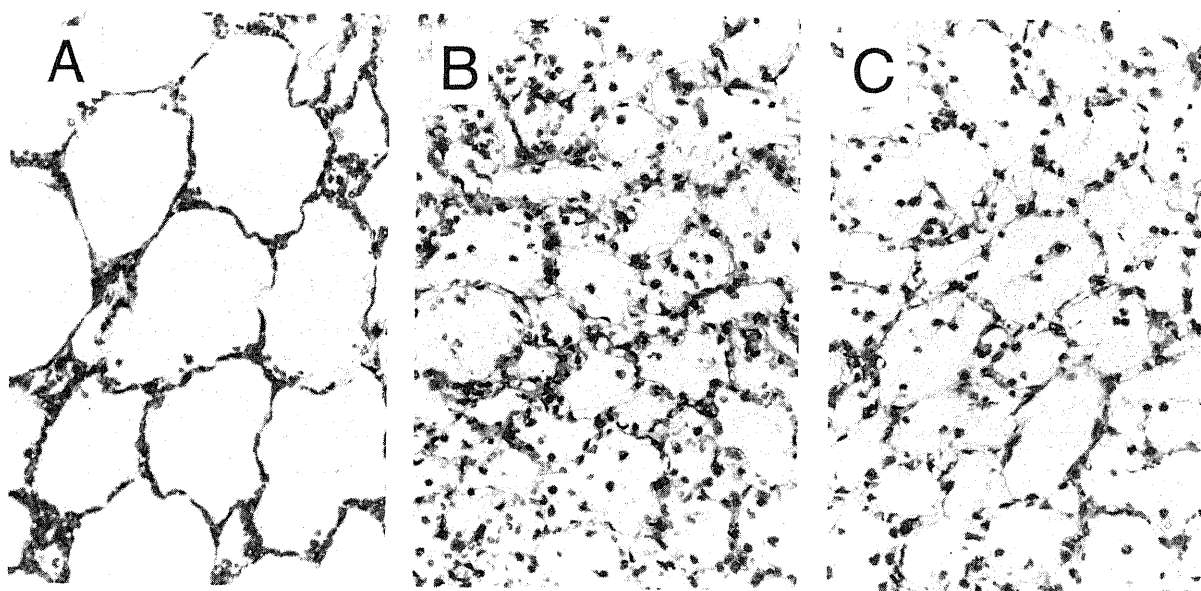


Fig. 10. Stained sections of the lungs of rat injected endotoxin into the trachea. Hematoxylin and eosin stain,  $\times 200$ . (A) Surfactant group. (B) Saline control group. (C) Air control group.

かった。一方、サーファクタント群の  $\text{PaCO}_2$  の平均値は、群分け後15分目に  $41\text{mmHg}$  (群分け直前値に対し  $P < 0.05$ ) に低下した。その後も、時間の経過とともに低下して、120分目以後には、生食対照群はもちろんのこと、空気対照群に比べても有意に低い値を示すようになった。

基準時の動的肺-胸郭コンプライアンスの平均値は、 $0.78\text{ ml/kg/cmH}_2\text{O}$  (全ラット,  $n=32$ ) であった。図7に示すように、本コンプライアンスは、エンドトキシン注入により、群分け直前に基準時の値の62%前後に低下した。なお、これらの値には、3群間で有意差を認めなかった。群分け後180分目に測定した生食対照群および空気対照群の値は、群分け直前時に比べ有意に変化していなかった。一方、サーファクタント群の値は、基準値の86%前後にまで回復した (生食対照群および空気対照群に対し  $P < 0.05$ , 群分け直前時の値に対し  $P < 0.05$ )。図8に減圧時肺圧量曲線を示す。サーファクタント群の肺気量は、 $30\text{cmH}_2\text{O}$  加圧時 (最大加圧時) から  $5\text{cmH}_2\text{O}$  に減圧するまでのすべての圧で、生食対照群および空気対照群に比べ有意に大きい値を示した。

図9にサーファクタント群 (A) と空気対照群 (C) の胸部レントゲン写真の一例を示す。エンドトキシン注入後、すべてのラットの肺野に、無気肺あるいは肺水腫の存在を示唆する両側性の浸潤影を認めた (上段)。群分け後、空気対照群 (C) では改善が認められなかったのに対して、サーファクタント群 (A) では、浸潤影の改善が認められた (下段)。なお、生食対照群のレントゲン写真は、空気対照群と同様の所見を示した。

図10に肺組織像を示す。生食対照群 (B) および空気対照群 (C) では、肺胞腔が小さく、肺胞腔内に好中球を多数認めた。一方、サーファクタント群 (A) では、肺胞腔が大きく、肺胞腔内への好中球の浸潤は生食対照群および空気対照群よりも少なかった。

## 考 察

ARDS を誘発する危険因子の一つとして敗血症があり<sup>14)15)</sup>,

特にエンドトキシンが血中に存在する場合、ARDS の発生率が高いと報告されている<sup>16)</sup>。エンドトキシンは、グラム陰性菌の細胞外壁のリポ多糖であり、補体系、凝固系および白血球を活性化する<sup>17)</sup>。ARDS では、白血球が肺の血管壁に集積した後、間質および肺胞腔に遊走する<sup>18)</sup>。白血球から放出される活性酸素やタンパク質分解酵素、アラキドン酸分解産物などが肺胞上皮や血管内皮細胞の透過性を亢進させると考えられている<sup>17)18)</sup>。その結果、エンドトキシン血症が原因でおきる ARDS では、肺水腫液が出現することになる。

ARDS の診断基準は、1) 急性発症、2) 酸素化の障害 ( $\text{PaO}_2/\text{吸気酸素分画}$  (fraction of inspired oxygen,  $\text{F}_i\text{O}_2$ )  $< 200\text{ mmHg}$ )、3) 胸部レントゲン写真で両側性の肺浸潤影の存在、および4) 肺動脈楔入圧が  $18\text{mmHg}$  以下と規定されている<sup>19)</sup>。今回は肺動脈楔入圧を測定することができなかったが、実験1の ZEEP 群は、上記の診断基準のうち少なくとも1項と2項を満たしている。また、実験2では全ラットが1, 2および3項を満たしている。したがって、これらの動物は、ARDS とみなして差し支えないものとする。前述したように、肺水腫やARDS の際に呼吸不全の治療には、PEEP を付加した人工呼吸の有効なことが周知されている<sup>1)~3)</sup>。その機序としては、虚脱した肺胞が再び含気を保つようになることと、機能的残気量の増加が関与していると考えられている<sup>20)~22)</sup>。しかし、PEEP は、心拍出量を低下させる作用を有し<sup>3)</sup>、無制限に高められない。また、PEEP を増加させても、呼吸不全の進行する症例が存在することも事実である。

一方、肺水量や ARDS の予防に関して PEEP が有効か否かには、一定の見解が得られていない<sup>1)3)22)23)</sup>。また、PEEP が、肺組織の変化および肺血管外水分量に影響を与えるか否かに関しても、測定結果は一定していない<sup>24)25)</sup>。しかし、今回の実験1で、エンドトキシンを気管内に注入したラットに対し PEEP を予防的に付加することにより、 $\text{PaO}_2$  の悪化が抑制され生存率が改善した。さらに、肺水腫液が減少し、肺圧量曲線が改善するという結果が得られた。Sohma ら<sup>26)</sup>も、塩酸を気管内に投

与したウサギに予防的に PEEP を付加すると、 $\text{PaO}_2$  を有意に高く保てたと報告している。また、Malo ら<sup>21)</sup>と Pare ら<sup>22)</sup>は、肺水腫に際して PEEP を付加すると、肺胞腔の液体が間質に移行すると報告している。今回の実験 1 の結果と上記の報告から、侵害刺激が肺に加えられた場合、予防的な PEEP の使用は、呼吸不全の発生を抑制すると結論できるであろう。

しかし、呼吸不全が完成した ZEEP 群に対して PEEP を付加しても、 $\text{PaO}_2$  は改善しなかった。また、予防的に PEEP を付加していても、気管支肺胞洗浄液中の好中球数は ZEEP 群との間に差がなく、炎症反応そのものは PEEP の有無に関係なく進行するものと考えられた。このことから、エンドトキシンが肺組織中に侵入した場合、ひとたび呼吸不全が生ずると、その後に PEEP を付加しても回復困難な変化の生ずることが示唆される。事実、PEEP に反応しない重篤な呼吸不全に陥った ARDS 患者に遭遇することは稀でなく、その治療法の開発が望まれている。

そこで著者は、PEEP で改善しない呼吸不全の治療法を見出す目的で、実験 2 を追加した。なお、この実験では、呼吸不全の動物モデルの作成に際し、エンドトキシンの注入後、臨床で一般に行われているように、低酸素血症が出現した時点で PEEP を段階的に増加させるという方法を用いた。その結果、エンドトキシン注入後 280 分前後に 4.7 ml/kg 前後の肺水腫液が出現し、7.5 cmH<sub>2</sub>O の PEEP を付加した人工呼吸でも改善困難な低酸素血症、コンプライアンスの低下、両肺野の浸潤影などを認めるようになった。また、これらの動物では、気管内吸引によって肺水腫液を取り除いても  $\text{PaO}_2$  が 200 mmHg 以上に上昇しなかった。したがって、呼吸不全の機序として、肺水腫液による気道の閉塞や肺胞腔の減少ということとは別の因子を考える必要がある。近年、肺水腫液にはサーファクタントを不活化する作用があることが見い出されている。このことから、呼吸不全の成立に、サーファクタントの不活化が関与している可能性は、無視できないと考えられる。

サーファクタントは、リン脂質を主成分とし、肺胞被覆層の表面張力を減少させることによって肺胞の虚脱と肺水腫液の漏出を防止する物質である<sup>67)</sup>。肺水腫液によってサーファクタントが 3 mg/ml 以下に希釈されると、その機能は消失すると報告されている<sup>12)</sup>。さらに、肺水腫液中のタンパク質は、サーファクタントの活性を阻害する<sup>28,29)</sup>。したがって、肺水腫液が出現すれば、サーファクタントの機能が障害されて、肺胞が虚脱し、呼吸不全が発生することになる。それに加えて、肺血管系と肺胞腔の静水圧差が逆転し<sup>30)</sup>、肺水腫がさらに進行するという悪循環に陥るものと考えられる。

肺洗浄によりサーファクタントを欠乏させたウサギを用いた実験で、PEEP とサーファクタント補充療法の併用がガス交換を有意に改善すると報告されている<sup>31)</sup>。今回の実験 2 でも、サーファクタント補充をうけた動物のガス交換、コンプライアンス、胸部レントゲン所見および肺の組織学的所見などには、有意な改善が認められた。特に  $\text{PaO}_2$  は、サーファクタント投与後 15 分以内に 300 mmHg 近く増加した。肺胞上皮や血管内皮細胞の透過性の亢進により出現した肺水腫液が、このような短時間で消失するとは考え難い。肺水腫液中のタンパク質によるサーファクタントの阻害は、大量のサーファクタントを加えることにより拮抗できると言われている<sup>28,32)</sup>。したがって、サーファクタントの投与により肺胞被覆層の表面活性が改善した結

果、虚脱した肺胞の内腔が保たれるようになり、呼吸不全が短時間で改善したものと考えられる。

Kobayashi ら<sup>33)</sup>は、塩酸の気管内注入により肺水腫が生じたウサギに対し、肺洗浄でサーファクタント阻害物質を除去したうえ、50 mg/kg のサーファクタントを補充すると、呼吸不全が改善したと報告している。しかし、肺洗浄は必ずしも安全な操作であると言い難く、とくに呼吸不全の患者では危険を伴う。今回の実験では、Kobayashi らの実験に比べ 2 倍量 (100 mg/kg) のサーファクタントを投与し、肺洗浄を施行しなくても良好な結果を得た。すなわち、今回の実験結果は、肺水腫液が存在していても、大量のサーファクタントを投与することにより、肺水腫液の有害な作用を打ち消すことが出来るという見解を支持するものでもあろう。

エンドトキシンを静脈内に投与すると、急性呼吸不全とともに重篤な低血圧が発生する (田代、未発表)。本研究では、循環系の抑制を少なくし、呼吸器系の変化について調査することを主眼とし、エンドトキシンを気管内に投与した。しかし、ヒトでは、エンドトキシンが経気道的に肺に到達して ARDS が発症することは稀であろう。今回の実験結果を臨床症例に応用するためには、静脈路からエンドトキシンを投与した動物に対しても同様の結果が得られるか否かを検討する必要がある。また、サーファクタントが炎症反応にどのような影響を与えるかについても調査する必要がある。検討を要する問題も多いが、今回の実験結果から、敗血症が原因でおきる ARDS の予防には、PEEP が有効であると結論された、さらに、治療法としてサーファクタント補充療法を応用できる可能性のあることが強く示唆された。

## 結 論

ラットの気管内に大腸菌エンドトキシンを注入し、PEEP およびサーファクタント補充療法の効果を検討し、次の結論を得た。

1. 60 mg/kg のエンドトキシンを気管内に注入した場合、ZEEP 下では急激に呼吸不全が発生する。この呼吸不全は、120 分後に PEEP を付加しても改善し難い。一方、予防的に PEEP を付加しておくと、好中球の肺への集積を防止できないが、肺水腫液の量が減少して呼吸不全の進行が抑制され、生存率が改善する。
2.  $53 \pm 19$  mg/kg のエンドトキシンを気管内注入し低酸素血症が出現した時点で PEEP を段階的に増加させた場合、肺水腫液を伴う呼吸不全が出現する。この状態も、PEEP を付加した人工呼吸のみでは改善が困難である。
3. エンドトキシンの気管内注入後に発症する呼吸不全の機序には、肺水腫液によるサーファクタントの希釈と不活性化が関与していると考えられる。
4. エンドトキシンの気管内注入後による呼吸不全に対して、サーファクタント補充療法を行うと、血液ガス所見、肺コンプライアンス、胸部レントゲン所見および肺組織所見が改善する。しかし、この方法を臨床に応用するためには、静脈路からエンドトキシンを投与した動物に対しても有効か否かを検討する必要がある。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、直接御指導と御校閲をいただいた小林 勉教授

に深く感謝いたします。また、実験にご協力いただいた麻酔・蘇生学教室の教員の方々に深く感謝いたします。なお、本研究は、文部省科学研究費(課題番号05671254および07457353)の援助を受けたことを付記し、謝意を表します。

本論文の要旨は、Fourth International Symposium on Lung Surfactant: Basic Research in The Pathogenesis of Lung Disorders (1992, Marburg, Germany) において発表した。

## 文 献

- 1) Rinaldo JE, Rogers RM. Adult respiratory distress syndrome: changing concepts of lung injury and repair. *N Engl J Med* 306: 900-909, 1982
- 2) Hickling KG. Ventilatory management of ARDS: can it affect the outcome? *Intensive Care Med* 16: 219-226, 1990
- 3) Weisman IM, Rinaldo JE, Rogers RM. Positive end-expiratory pressure in adult respiratory failure. *N Engl J Med* 307: 1381-1384, 1982
- 4) Montgomery AB, Stager MA, Carrico CJ, Hudson LD. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 132: 485-489, 1985
- 5) Krausz T, Cohen J. Shock. In JD McGee, PG Isaacson, NA Wright (eds), *Oxford Textbook of Pathology*, p540-551. Oxford University Press, Oxford, 1992
- 6) Holm BA, Matalon S. Role of pulmonary surfactant in the development and treatment of adult respiratory distress syndrome. *Anesth Analg* 69: 805-818, 1989
- 7) Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 147: 218-233, 1993
- 8) Lachmann B, Van Daal GJ. Adult respiratory distress syndrome: animal models. In B Robertson, LMG Van Golde, JJ Batenburg (eds), *Pulmonary Surfactants: From Molecular Biology to Clinical Practice*, p203-211, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1992
- 9) Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y, Abe T. Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet* 1: 55-59, 1980
- 10) Collaborative European Multicenter Study Group. Surfactant replacement therapy for severe neonatal respiratory distress syndrome: an international randomized clinical trial. *Pediatrics* 82: 683-691, 1988
- 11) Jobe AH. Pulmonary surfactant therapy. *N Engl J Med* 328: 861-868, 1993
- 12) Kobayashi T, Shido A, Nitta K, Inui S, Ganzuka M, Robertson B. The critical concentration of surfactant in fetal lung liquid at birth. *Respir Physiol* 80: 181-192, 1990
- 13) Enhörning G, Robertson B. Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics* 50: 58-66, 1972
- 14) Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 144: 124-130, 1982
- 15) Shale DJ. The adult respiratory distress syndrome-20 years on. *Thorax* 42: 641-645, 1987
- 16) Danner RL, Elin RJ, Hossini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 99: 169-175, 1991
- 17) Neuhoef H. Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure. *Acta Anaesthesiol Scand* 35 (Suppl 95): 7-14, 1991
- 18) Tate RM, Repine JE. Neutrophils and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 128: 552-559, 1983
- 19) Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, Spragg R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824, 1994
- 20) Hillman DR. Physiologic aspects of intermittent positive pressure ventilation. *Anaesth Intens Care* 14: 226-235, 1986
- 21) Malo J, Ali J, Wood LDH. How does positive end-expiratory pressure reduce intrapulmonary shunt in canine pulmonary edema? *J Appl Physiol* 57: 1002-1010, 1984
- 22) Weigelt JA, Mitchell RA, Snyder WH III. Early positive end-expiratory pressure in the adult respiratory distress syndrome. *Arch Surg* 114: 497-501, 1979
- 23) Pepe PE, Hudson LD, Carrico CJ. Early application of positive end-expiratory pressure in patients at risk for the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 311: 281-286, 1984
- 24) Myers JC, Reilley TE, Cloutier CT. Effect of positive end-expiratory pressure on extravascular lung water in porcine acute respiratory failure. *Crit Care Med* 16: 52-54, 1988
- 25) Nieman G, Bredenberg CE, Paskanik AM. Positive end-expiratory pressure accelerates lung water accumulation in high surface tension edema. *Surgery* 107: 156-162, 1990
- 26) Sohma A, Brampton WJ, Dunnill MS, Sykes MK. Effect of ventilation with positive end-expiratory pressure on the development of lung damage in experimental acid aspiration pneumonia in the rabbit. *Intensive Care Med* 18: 112-117, 1992
- 27) Paré PD, Warriner B, Baile EM, Hogg JC. Redistribution of extravascular water with positive end-expiratory pressure in canine pulmonary edema. *Am Rev Respir Dis* 127: 590-593, 1983
- 28) Kobayashi T, Nitta K, Ganzuka M, Inui S, Grossmann G, Robertson B. Inactivation of exogenous surfactant by pulmonary edema fluid. *Pediatr Res* 29: 353-356, 1991
- 29) Seeger W, Stöhr G, Wolf HR, Neuhoef H. Alteration of surfactant function due to protein leakage: special interaction with fibrin monomer. *J Appl Physiol* 58: 326-338, 1985
- 30) Jobe A, Ikegami M, Jacobs H, Jones S, Conaway D. Permeability of premature lamb lungs to protein and the effect of surfactant on that permeability. *J Appl Physiol* 55: 169-176, 1983
- 31) Kobayashi T, Kataoka H, Ueda T, Murakami S, Takada Y, Kokubo M. Effects of surfactant supplement and end-expiratory pressure in lung-lavaged rabbits. *J Appl*



Physiol 57: 995-1001, 1984

32) Holm BA, Notter RH, Finkelstein JN. Surface property changes from interactions of albumin with natural lung surfactant and extracted lung lipids. Chem Phys Lipids 38: 287-298, 1985

33) Kobayashi T, Ganzuka M, Taniguchi J, Nitta K, Murakami S. Lung lavage and surfactant replacement for hydrochloric acid aspiration in rabbits. Acta Anaesthesiol Scand 34: 216-221, 1990

**Effects of Positive End-Expiratory Pressure and Surfactant Replacement on Respiratory Failure Caused by Intratracheal Endotoxin in Rats** Katsumi Tashiro, Department of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med Soc., 105, 587—595 (1996)

**Key words** acute respiratory distress syndrome, endotoxin, lung edema, positive end-expiratory pressure, surfactant

#### Abstract

The effects of positive end-expiratory pressure (PEEP) and surfactant replacement were investigated in 56 adult rats which were suffering from respiratory failure caused by intratracheal endotoxin. Experiments one and two were performed on the rats anesthetized with intraperitoneal pentobarbital and mechanically ventilated with pure oxygen at 25 cmH<sub>2</sub>O peak inspiratory pressure. In experiment 1, the animal were injected 60 mg/kg of *Escherichia coli* endotoxin into the trachea. In the rats ventilated with zero end-expiratory pressure (ZEEP), the arterial oxygen pressure (PaO<sub>2</sub>) rapidly decreased from around 500 mmHg to 98±68 mmHg (±SD, n=12) 30 min after the endotoxin injection. In the rats ventilated with 7.5 cmH<sub>2</sub>O PEEP throughout the experiment, the PaO<sub>2</sub> remained around 430 mmHg (n=12) until the end of the experiment (120 min after injection), showing a significant difference (P<0.05) from the animals with ZEEP. Although volume of lung edema fluid was significantly decreased, PEEP did not affect the number of neutrophils in the bronchoalveolar lavage fluid. In experiment 2, the animals were injected 53±19 mg/kg of endotoxin, and then PEEP was increased stepwise to 7.5 cmH<sub>2</sub>O with fall of the PaO<sub>2</sub>. Around 280 min after injection, the animals developed respiratory failure similar to acute respiratory distress syndrome: the PaO<sub>2</sub> decreased from around 521 mmHg to 106±23 mmHg, and a diffuse infiltrate appeared in the chest roentgenogram. Then the animals were randomly assigned to three groups. The saline control (n=8) and air control groups (n=8) were administered 2.0 ml/kg of normal saline and air, respectively. The surfactant group (n=16) was administered 2.0 ml/kg of a modified natural porcine surfactant (50 mg/ml). The PaO<sub>2</sub> of the saline and air control groups remained below 130 mmHg throughout the experiment (180 min after assignment). The PaO<sub>2</sub> of the surfactant group increased to 390±116 mmHg 15 min after the assignment (P<0.05 vs. control groups), and remained at around 400 mmHg throughout the experiment. Surfactant replacement also significantly improved the dynamic lung-thorax compliance, pressure-volume recordings of the lung, the chest roentgenograms, and histologic findings. It is concluded that prophylactic application of PEEP does not prevent accumulation of neutrophils in the lungs, but attenuates progress of respiratory failure caused by intratracheal endotoxin injection. It is also concluded that surfactant replacement shows therapeutic effects on the respiratory failure which resists PEEP.